Beiträge zur Biosynthese des Schilddrüsenhormons

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

PARWIZ TASLIMI
aus Kazwin/Iran

1959

Beiträge zur Biosynthese des Schilddrüsenhormons.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch - naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Parwiz Taslimi
aus Kazwin/Iran
1959

Dekan: Professor Dr.-Ing. H. Krüger

1. Berichterstatter: Dozent Dr.-Ing. G. Hillmann

2. Berichterstatter: Professor Dr.med.Dr.rer.nat. G. Weitzel

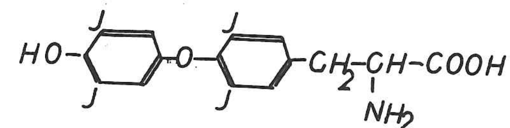
Tag der mündlichen Prüfung: 14. Januar 1960

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Inhaltsangabe.

I. Einleitung.

Die Schilddrüse ist chemisch durch ihren hohen Gehalt an organisch gebundenem Jod ausgezeichnet, das als jodhaltiges Protein, Thyreoglobulin, vorliegt (1-4). Durch alkalische Hydrolyse gelang es Kendall 1915 (5,6), einen kristallisierten Körper zu isolieren, dessen Strukturformel von Harington (7) durch Synthese aufgestellt werden konnte, das 3,5,3'5'-Tetrajodthyronin oder Thyroxin (Tx).

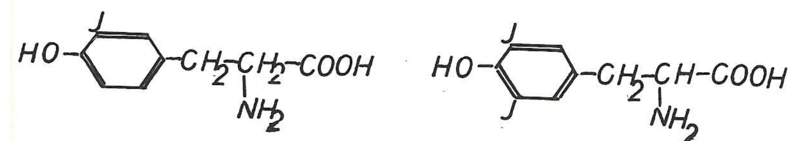


Durch die Arbeiten von Roche und Pitt-Rivers wurden weitere jodierte Thyronine (3',3-Dijodthyronin, 3'5',3-Trijodthyronin, 3',3,5-Trijodthyronin) bekannt, von denen das 3',3,5-Trijodthyronin (TITh) eine besonders hohe biologische Wirksamkeit besitzt (8-14).

Die Biosynthese der Schilddrüsenhormone erfolgt in mehreren Phasen. Das mit der Nahrung aufgenommene Jodid wird in der Schilddrüse zunächst gespeichert, wobei die Konzentration im Schilddrüsenepithel ungefähr das 5ooo fache gegenüber der Konzentration im Blut betragen kann. Durch Oxydasen, die im einzelnen noch nicht isoliert worden sind, wird das Jodid zum Jod oxydiert, das sofort mit dem Thyreoglobulin weiter reagiert (15-19).

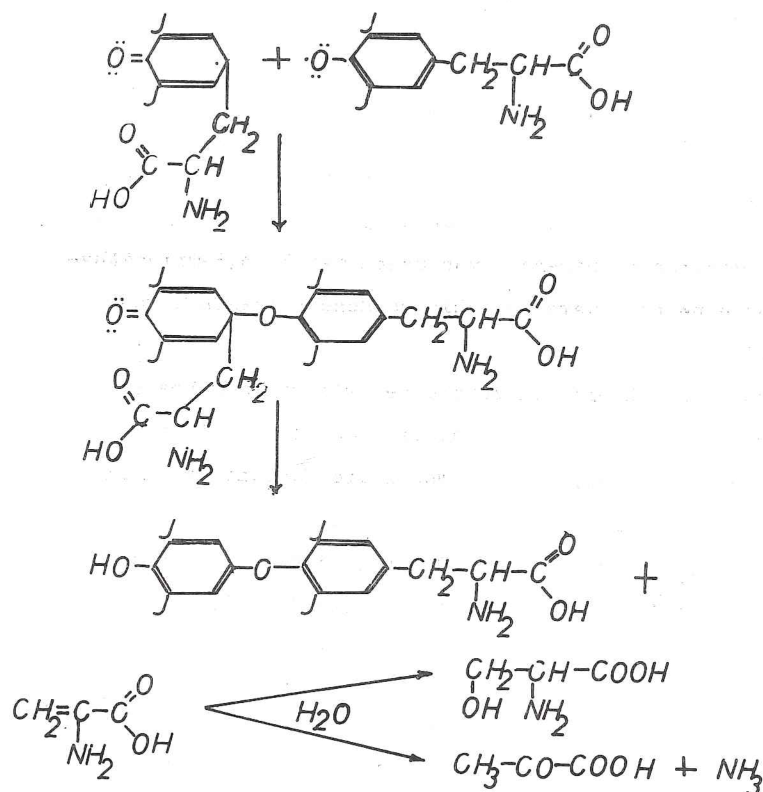
$$2\,J^- + 2\,e \longrightarrow J_2$$

Durch spezifische Enzyme wird das Jod in die Tyrosinreste zum Monojodtyrosin (MIT) und Dijodtyrosin (DIT) eingebaut (12,2o,21).



Je größer die zur Verfügung stehende Jodmenge ist, umso mehr DIT und umso weniger MIT wird gebildet (15). In der Form der Jodtyrosine liegen etwa 5o - 6o% des gesamten Jod in der Schilddrüse vor (22).

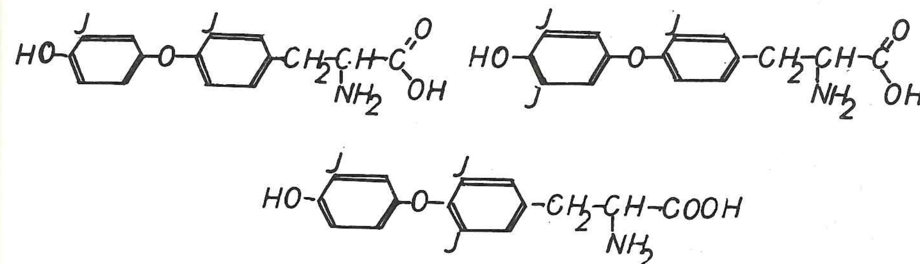
1927 nahmen zuerst Harington und Barger an (23), daß Thyroxin in vivo durch die Reaktion von 2 Molekülen DIT untereinander entsteht, wobei eine Alaninkette freigesetzt wird.



Zahlreiche, zuerst von Ludwig und v.Mutzenbecher (24,25) durchgeführte Experimente in vitro, bei denen nach der Einwirkung von Jod auf Proteine sowie bei der aeroben Inkubation von DIT

in alkalischem Medium Thyroxin entstand, konnten diese Vorstellung stützen.

Durch die Anwendung moderner biochemischer Methoden, besonders der Isotopentechnik mit Jod^{131} und der Papierchromatographie, konnte die Vorstellung, daß MIT und DIT als Vorstufen der biologisch wirksamen Jodthyronine: 3',3-Dijodthyronin, 3'5',3-Trijodthyronin, 3'3,5-Trijodthyronin und Thyroxin, anzusprechen sind, weiter erhärtet werden (26,27).

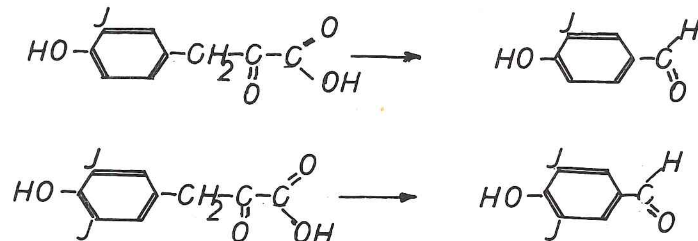


Der Reaktionsmechanismus der zur Bildung der Jodthyronine führenden Diphenyläther-Synthese ist noch ungeklärt. Es erscheint denkbar, daß die 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylbrenztraubensäure, das mögliche intermediäre Oxydationsprodukt bei der aeroben Inkubation von DIT oder dessen Derivaten, als energiereiches Zwischenprodukt bei der Thyroxin-Biosynthese in Frage kommt (28).

Die folgenden Untersuchungen hatten den Zweck, mit papierchromatographischen Methoden Zwischenprodukte der Thyroxin-Biosynthese bei der Aufarbeitung J^{131} markierter Rattenschilddrüsen nachzuweisen. Ferner sollten durch Inkubationsversuche in vitro weitere Hinweise über den Mechanismus dieser Biosynthese ermittelt werden.

II. Nachweis von MIBA und DIBA aus Rattenschilddrüsen-Extrakten ohne und mit enzymatischer Hydrolyse.

Bei der Biosynthese der Jodthyronine aus DIT und MIT sollen nach der Vorstellung von Hillmann (28) die analogen Ketosäuren als Zwischenprodukte auftreten. Diese Ketosäuren sind jedoch außerordentlich instabil und konnten aus Thyreoidea-Hydrolysaten bisher nicht nachgewiesen werden. Da jedoch die 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylbrenztraubensäure und die nicht in Reinsubstanz herstellbare 4-Hydroxy-3-jod-phenylbrenztraubensäure in ammoniakalischen Lösungen sehr leicht zu den entsprechenden substituierten Benzaldehyden, 4-Hydroxy-3,5-dijod-benzaldehyd und 4-Hydroxy-3-jod-benzaldehyd (DIBA und MIBA) zerfallen (Hillmann und Keil, unveröffentlichte Befunde), sollten diese Aldehyde aus Jod^{131} markierten Rattenschilddrüsen ohne und mit enzymatischer Hydrolyse mit papierchromatographischen Methoden nachgewiesen werden.



Als Ausgangsmaterial dienten Schilddrüsen von Ratten, denen loo C Radiojod/Tier injiziert worden war. Die Schilddrüsen der Tiere, die nach verschiedenen Zeitabständen - 48 bis 72 Stunden nach der Injektion - getötet worden waren, wurden in konzentrierter Ameisensäure gelöst und nach Verdünnen mit Wasser mit Butanol extrahiert. Dieses Extraktionsverfahren erwies sich als günstiger zur Gewinnung nicht proteingebundener Metaboliten des

Jodstoffwechsels als die üblicherweise direkte Extraktion homogenierter Schilddrüsen.

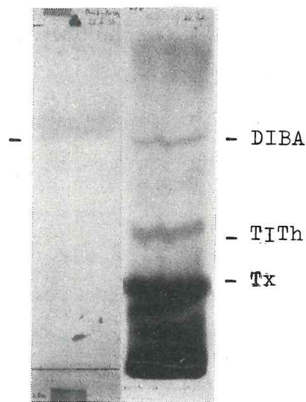
Diesem Butanol-Extrakt wurden synthetisches MIBA und DIBA zugesetzt und nach dem schonenden Einengen direkt in verschiedenen Lösungsmitteln papierchromatographiert.

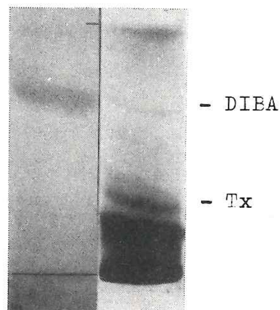
Ferner wurden Versuche angestellt, MIBA und DIBA durch Verteilungsverfahren anzureichern. Als günstigstes Extraktionsmittel erwies sich Benzol bei pH 5, in dem MIBA und DIBA praktisch quantitativ aus einer Mischung von Jodthyroninen abgetrennt werden konnten.

Die Radioautographie zeigte jedoch, daß auch in Benzol die Jodtyrosine und Jodthyronine bei der Extraktion markierter Schilddrüsen mit eluiert werden. Extraktionsmittel, die sich spezifisch zur Abtrennung der Jodbenzaldehyde eignen, wurden nicht gefunden. Die gesamte Radioaktivität der Benzol-Extrakte betrug nur etwa 5% derjenigen der Butanol-Extrakte; da in den Benzol-Extrakten noch weitere aus der Thyreoidea stammende Verbindungen enthalten waren, kann man von der gemessenen Radioaktivität allein nicht auf die Konzentration an MIBA und DIBA schließen.

Für den papierchromatographischen Nachweis von MIBA und DIBA erwiesen sich die Systeme Amylenhydrat/5n Ammoniak, Isoamylalkohol/5n Ammoniak und Butanol/2n Ammoniak als besonders geeignet, da die Aldehyde von den in den Thyreoidea-Extrakten vorhandenen weiteren Verbindungen gut getrennt werden konnten. Die folgenden Abbildungen zeigen Papierchromatogramme (links) von Amylenhydrat- und Benzol-Extrakten aus Rattenthyreoidea-Homogenaten ohne enzymatische Hydrolyse, denen MIBA und DIBA zugesetzt worden waren.

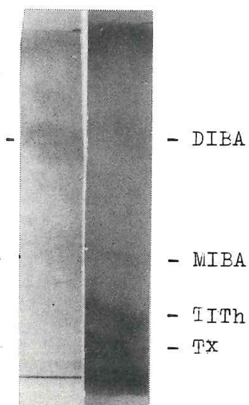
Die aus diesen Streifen hergestellten Radioautogramme (rechts) zeigen, daß die entsprechenden Banden übereinstimmen. Die Gesamtmenge DIBA und MIBA in den Benzol-Extrakten liegt unter 1%.





System III System VII

Schilddrüsen von lo Ratten in konz. Ameisensäure gelöst, Amylenhydrat-Extrakt, dem synth. DIBA zugesetzt worden war.

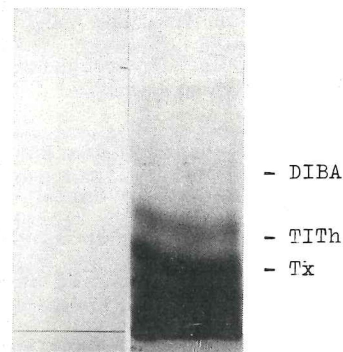


Schilddrüsen von 2o Ratten in konz. Ameisensäure gelöst, Benzol-Extrakt, dem synth. MIBA und DIBA zugesetzt worden waren.

System III

Nach der Butanol-Extraktion wurden die in Ameisensäure gelösten Rattenschilddrüsen enzymatisch hydrolysiert. Die besten Ergebnisse lieferte die Verwendung von Pankreatin (Merck) in m/2o Phosphatpuffer-Lösung bei pH 8,4. Pilzprotease (Boehringer) hydrolysierte unvollständig.

Die Thyreoidea-Hydrolysate wurden wie die nicht enzymatisch hydrolysierten Thyreoidea-Homogenate aufgearbeitet. Auch hier wurden wieder Papierchromatogramme der Amylen- oder Benzol-Extrakte hergestellt und radioautographiert. Wie die folgenden Bilder zeigen, ergaben sich übereinstimmende Banden.

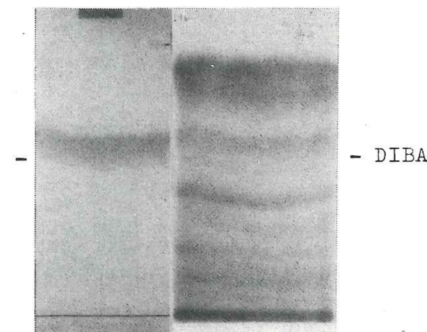


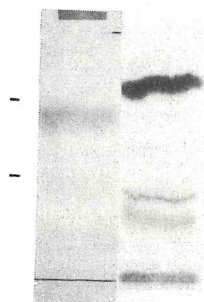
Pankreatin - Hydrolysat von 5 Rattenschilddrüsen, Amylenhydrat-Extrakt, dem synth. DIBA zugesetzt worden war.

System III

Pankreatin - Hydrolysat von lo Rattenschilddrüsen, Benzol-Extrakt, dem synth. DIBA zugesetzt worden war.

System III→



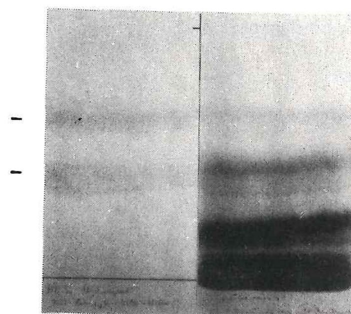


Pankreatin - Hydrolysat von lo Rattenschilddrüsen, Benzol-Extrakt, dem synth. MIBA und DIBA zugesetzt worden waren.

System III

Neben den oben angeführten Untersuchungen an enzymatisch hydrolysierten Rattenschilddrüsen wurden auch Versuche unternommen, das Vorkommen von MIBA und DIBA in J^{131} markierten Rattenschilddrüsen nachzuweisen, die nach der Methode von Hillmann (29) durch loo stündiges Kochen in konz. Ameisensäure hydrolysiert worden waren.

Die folgende Abbildung zeigt ein Papierchromatogramm des Butanol-Extraktes eines Ameisensäure-Hydrolysates von lo Rattenschilddrüsen, dem synth. MIBA und DIBA zugesetzt worden waren und das entsprechende Radioautogramm. Auch in diesem Fall stimmen die MIBA und DIBA entsprechenden Banden überein.



System III

Kontrollversuche zeigten, daß MIBA und DIBA unter den oben genannten Versuchsbedingungen weder durch Kochen mit Ameisensäure noch unter den Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse aus MIT und DIT entstehen.

III. Modellversuche zur Thyroxin - Synthese.

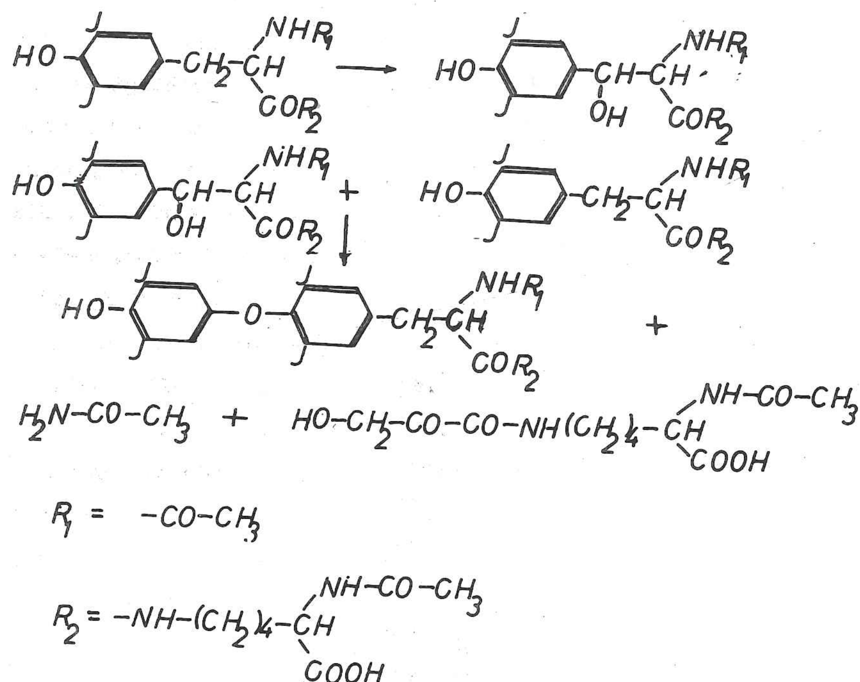
Zur Stützung der Vorstellung von Harington und Barger (23), daß Tx in vivo durch eine Reaktion von 2 Molekülen DIT unter Freisetzung einer Alaninseitenkette entsteht, wurden zahlreiche Experimente in vitro unternommen.

1936 zeigten Ludwig und v.Mutzenbecher (24), daß nach Inkubation von Kasein in schwach alkalischer Lösung unter Zugabe von großen Mengen Jod die Bildung von Tx im Protein innerhalb von 24 h beobachtet werden konnte. Diese Tatsache konnte auch bei Untersuchungen an anderen Proteinen bestätigt werden (3o). Neutrale oder leicht alkalische Inkubation von DIT bei 37^{o} liefert nur Spuren von Tx (25). Die Ausbeute kann jedoch beträchtlich erhöht werden, wenn H_2O_2 zugefügt wird (31). Sie kann weiter gesteigert werden, wenn DIT durch das N-acetyl-Derivat ersetzt wird (7-1o%) oder durch N-acetyl-DIT-Peptide (55% bei Inkubation von N-acetyl-DIT-Glutaminsäure (3o,32). Der Schutz der Carboxyl- und der Aminogruppe im DIT scheint die Ausbeute der Kondensationsreaktion zu erhöhen.

Die Derivate des Alaninrestes, die bei der Kondensation von 2 Molekülen DIT zu Tx eliminiert werden, sollen aus Oxydationsprodukten wie Serin und Brenztraubensäure (33) oder aus N-acetyl-alanin bei Verwendung von N-acetyl-DIT (34) bestehen. Deshalb nehmen einige Autoren an, daß bei der Reaktion ein labiles Zwischenprodukt von chinoider Struktur (35,36) entsteht und Dehydroalanin freigesetzt wird, welches durch Oxydation in Brenztraubensäure und NH_3 oder durch Wasseranlagerung in Serin umgewandelt wird.

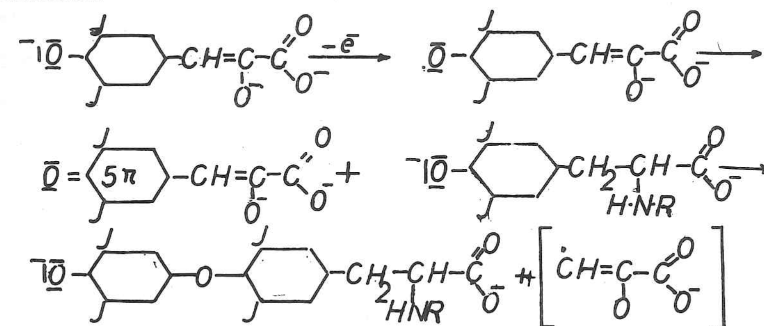
Untersuchungen von Pitt-Rivers (37), bei denen N-acetyl-dijod-tyrosyl-ε-N-(α-N-acetyl)-l-lysin in schwach alkalischer Lösung inkubiert wurde, führten zu folgenden Reaktionsprodukten: das entsprechende Tx-Derivat, ε-N-Hydroxy-pyruvoyl-α-N-acetyl-lysin und Acetamid.

Da im Gegensatz zu anderen Autoren (Johnson und Tewkesbury, 35) keine Brenztraubensäure gefunden wurde, nimmt Pitt-Rivers folgenden Reaktionsmechanismus an:



Nach Untersuchungen von Hillmann (28), bei denen nach anaerober Inkubation von DIT und 4-Hydroxy-dijod-phenylbrenztraubensäure (DIB) eine Tx-Bildung beobachtet werden konnte, jedoch nicht bei der anaeroben Inkubation von DIT allein, erscheint es möglich, daß DIB bei der aeroben Inkubation von DIT oder

dessen Derivaten als intermediäres Oxydationsprodukt in Frage kommt und als energiereiches Zwischenprodukt bei der Tx-Synthese eine Rolle spielt. Diese Synthese könnte nach folgendem Schema verlaufen:



Für die Erklärung des Reaktionsverlaufes erschien es wichtig die Frage zu prüfen, ob eine Oxydation an der NH_2- bzw. NH-R-Gruppe für die Diphenyläther-Synthese notwendig ist. Durch Blockierung der Aminogruppe mit Substituenten, die eine Überführung in Imino- oder Ketoderivate verhindern bzw. erschweren, könnte eine Diphenyläther-Synthese verhindert werden, wenn der oxydative Abbau der Alaninseitenkette durch Oxydation am Stickstoff erfolgt.

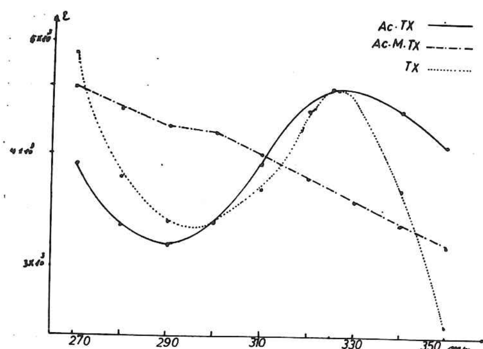
Für diese Fragestellung schien es wichtig, das Verhalten des N-acetyl-N-methyl-3,5-DIT bei der aeroben Inkubation zu prüfen, da durch Einführung einer Methylgruppe eine Blockierung des Stickstoff bei weitgehender Erhaltung der Elektronenverteilung erfolgt.

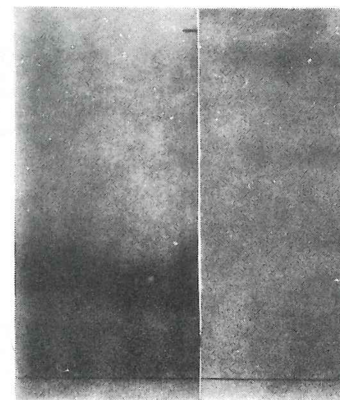
Zum Vergleich wurden daher in analogen Ansätzen inkubiert:

a) N-acetyl-N-methyl-3,5-dijod-tyrosin (AcMDIT)
b) 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylessigsäure (DIE)
c) 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylpropionsäure (DIP)

Neben den möglicherweise gebildeten Tx-Derivaten sollte das Vorkommen von DIBA in den Inkubationsansätzen geprüft werden.

a) Durch eine Lösung von 2,2 g N-acetyl-N-methyl-DIT in 12o ml m/1o Phosphatpuffer pH 7,8 wurde 18 Tage lang über eine Fritte Luft geblasen, wobei das pH jeden zweiten Tag neu eingestellt wurde. Anschließend wurde die Lösung bei pH 7,8 dreimal mit je 5o ml Butanol extrahiert, der Butanol-Extrakt auf 1o ml eingeengt und mit Petroläther versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wurde in System III und IV papierchromatographiert. Im U.V.-Licht von 32o mμ wurden die Rf-Werte ermittelt und die Papierchromatogramme teilweise nach Kendall mit Nitrit und teilweise mit Dinitrophenylhydrazin angefärbt. Dabei konnten weder AcMTx noch DIBA nachgewiesen werden.
Auch bei Hydrolyse des Niederschlages mit Eisessig/konz. HCl 1:1 bzw. 4n NaOH konnte kein Tx papierchromatographisch gefunden werden.
Zur Stützung dieser Ergebnisse wurde der Butanol/Petroläther-Niederschlag erneut in Butanol gelöst und dreimal mit 2n NaOH extrahiert. Die folgende Abbildung zeigt das Spektrum der extrahierten Butanollösung im Vergleich zu Tx und AcTx, welches in analoger Weise durch aerobe Inkubation von N-acetyl-DIT erhalten worden war.





Die nebenstehende Abbildung zeigt Papierchromatogramme des Inkubationsansatzes von N-acetyl-N-methyl-DIT im Vergleich mit dem durch Inkubation erhaltenen AcTx.

System III

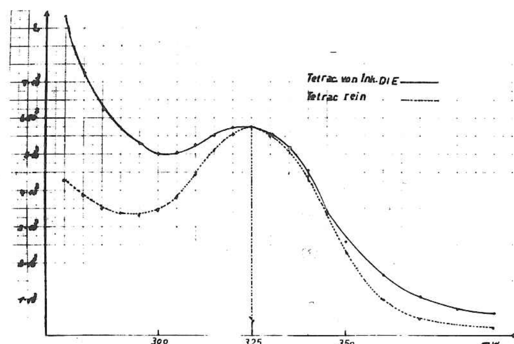
Zur Prüfung auf DIBA wurden die oben erhaltenen NaOH-Extrakte auf pH 5 gebracht und mit Benzol ausgeschüttelt, die Benzollösung eingeengt und in System III und IV papierchromatographiert. DIBA wurde nicht gefunden.

b) 2g DIE wurden in 1oo ml m/1o Phosphatpuffer pH 7,8 wie bei Versuch a) inkubiert und in gleicher Weise aufgearbeitet. Nach Papierchromatographie des Butanol/Petroläther - Niederschlages in den Systemen III und IV konnte auf das Vorhandensein von 4-Hydroxy-3,5-3'5'-tetrajod-thyreoessigsäure (Tetrac) und DIBA geschlossen werden.
Zum Nachweis von Tetrac wurden 2o mg des Butanol/Petroläther-Niederschlages in konz. Ammoniak gelöst und auf einem 4o cm langen Streifen des dickeren Papieres neben reiner Tetrac in System III und IV papierchromatographiert. Nach dem Anfärben eines Probestreifens wurden die unteren 1o cm des Papierchromatogrammes abgeschnitten und dasselbe nochmals in System III und IV chromatographiert. Hierbei ergaben sich übereinstimmende Rf-Werte von o,37.

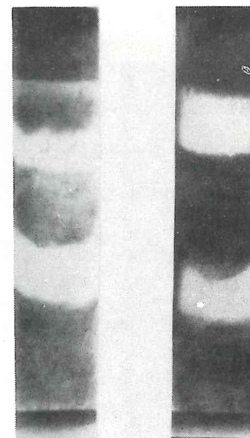
Die nebenstehende Abbildung zeigt das Papierchromatogramm der durch Inkubation erhaltenen Tetrac neben reiner Tetrac (recht

System III

Tetrac wurde von den Papierchromatogrammen mit n/lo NaOH eluiert und vom Eluat ein U.V.-Spektrum im Vergleich zu reiner Tetrac aufgenommen. Es ergaben sich folgende übereinstimmende Kurven mit einem Maximum bei 325 mμ.



Zur Bestimmung der Ausbeute wurden 27 mg des Niederschlages wie oben angegeben papierchromatographiert, eluiert und die Extinktion der Eluate bei 325 mμ gemessen. Daraus ergab sich eine Ausbeute an Tetrac von 7%.
Zum Nachweis von DIBA wurden 27 mg des Niederschlages in System III und IV papierchromatographiert. Im U.V.-Licht ergaben sich übereinstimmende Rf-Werte von o,67.



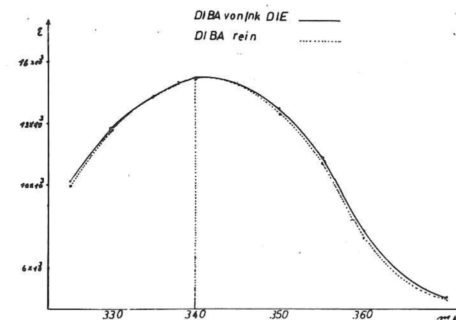
- DIBA

-Tetrac

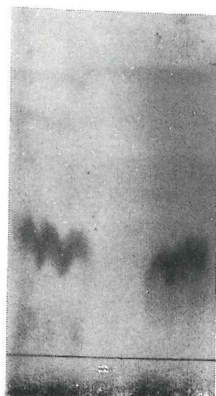
Die nebenstehende Abbildung zeigt eine Aufnahme der Papierchromatogramme im U.V.-Licht.

System III System IV

Zur Bestimmung der Ausbeute an DIBA wurde die entsprechende Bande auf dem Papierchromatogramm mit Tetrahydrofuran eluiert und das Eluat zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in lo ml n/lo NaOH gelöst und ein Spektrum im Vergleich zu reinem DIBA aufgenommen. Die Kurven mit einem Maximum bei 34o mμ ergaben Übereinstimmung. Die Ausbeute betrug 2,4%.



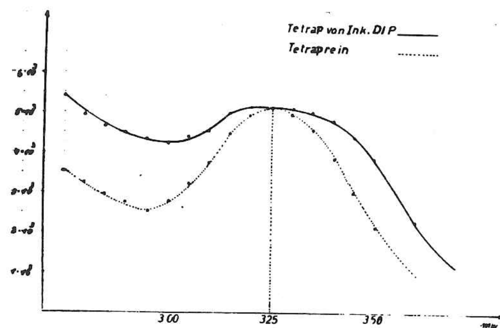
c) 3,6g DIP wurden in 18o ml Phosphatpuffer pH 7,8 wie bei Versuch a) und b) 18 Tage lang inkubiert und ebenso weiter verarbeitet.



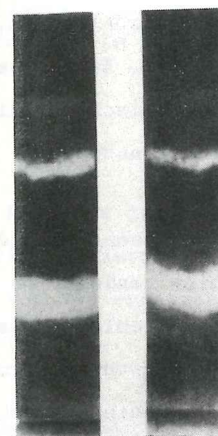
Die Papierchromatogramme des Butanol/Petroläther-Niederschlages in System III und IV im Vergleich mit reiner 4-Hydroxy-3,5-3'5'-tetrajodthyreopropionsäure (Tetrap) ergaben übereinstimmende Rf-Werte von o,37.

System III

Das Spektrum des Papierchromatogramm-Eluates zeigte im Vergleich mit reiner Tetrap übereinstimmend ein Maximum bei 325 mμ. Die Ausbeute wurde wie bei b) bestimmt und betrug 2,5%.



Auch in diesem Fall konnte DIBA in gleicher Weise wie bei b) nachgewiesen werden.



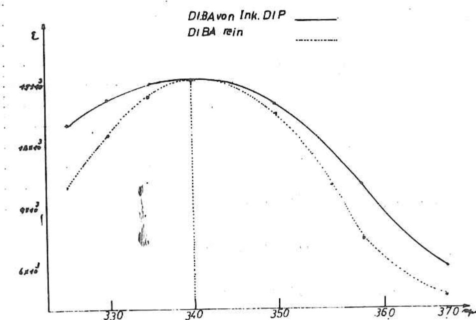
- DIBA

- Tetrap

Die Abbildung zeigt eine Aufnahme der Papierchromatogramme im U.V.-Licht.

System III System IV

Auch das Spektrum des Papierchromatogramm-Eluates ergab Übereinstimmung mit DIBA. Die Ausbeute betrug o,12%.



IV. Nachweis von Thyroxamin.

Bei der radioautographischen Identifizierung von Spaltprodukten aus J^{131} markierten Rattenthyreoidea-Extrakten fanden sich in NH_3-haltigen papierchromatographischen Systemen Frontbanden, denen bisher keine Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Es sollte nun geprüft werden, ob diese Frontbanden als chemisch definierte Stoff oder, wie bisher angenommen, als Artefakte anzusehen sind.

Nach der Lage der Rf-Werte konnte es sich um basische Peptide, biogene Amine oder Methyläther der Jodthyronine handeln. Da durch Untersuchungen von Hillmann und Keil ausgeschlossen werden konnte, daß diese Frontbanden aus Jodthyronin-O-methyläthern bestehen, sollte das mögliche Vorkommen von biogenen Aminen der jodierten Aminosäuren, und zwar vor allem von Thyroxamin, geprüft werden. Das Thyroxamin, das bereits seit 1932 synthetisch hergestellt wurde, besetzt ca. 1/1o der peripheren Wirkung des Thyroxins. Ein chemischer Nachweis von Thyroxamin, dessen intrazellulares Vorkommen aufgrund pharmakologischer Testierungen angenommen wurde, erfolgte bisher nicht (38).

Es wurden untersucht

a) Ratten-Thyreoidea-Homogenate

b) Rattenplasma

c) Humanplasma

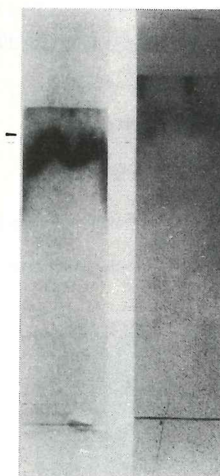
a) Zu dem Butanol-Extrakt J^{131} markierter Rattenschilddrüsen wurde synth. Thyroxamin zugegeben und durch Cokristallisation - wiederholtes Ausfällen des Thyroxamins aus HCl-alkoholischer Lösung mit konz. Ammoniak und Messung der spezifischen Radioaktivität - die Frage nach der Einheitlichkeit der Frontbanden geprüft.

Tabelle 1 .

Cokristallisation mit Thyroxamin aus Rattenthyreoidea-Homogenaten, 5. - 8. Cokristallisation.

isoliertes Thyroxamin in mg	Aktivität in Imp/min	spezifische Aktivität
13,5	3 84o	29o
12,5	3 552	287
11,3	3 22o	28o
1o,6	2 8o7	27o

Zum Nachweis der Abtrennung des Thyroxamins wurden Proben der Cokristallisation papierchromatographisch auf Reinheit geprüft und von den erhaltenen Papierchromatogrammen Radioautogramme angefertigt.

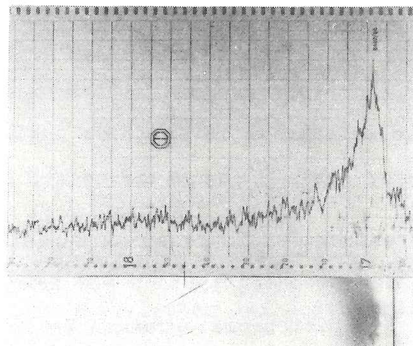


Die nebenstehende Abbildung zeigt ein Papierchromatogramm und das entsprechende Radioautogramm, wobei sich übereinstimmende Banden ergaben.

System VI

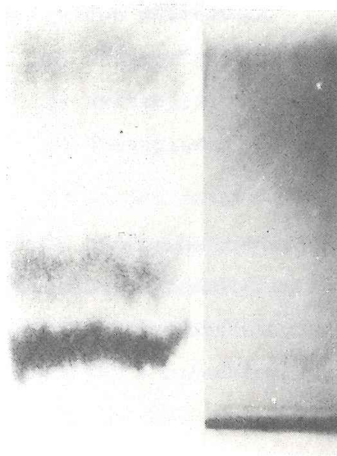
Eine weitere Probe wurde in System III papierchromatographiert, die Thyroxamin entsprechende Bande mit Tetrahydrofuran eluiert, absteigend im System VIII papierchromatographiert und die Radioaktivität des Streifens gemessen.

Auch in diesem System stimmte die Radioaktivität mit der Lage der Bande überein, wie aus folgendem Bild ersichtlich ist.



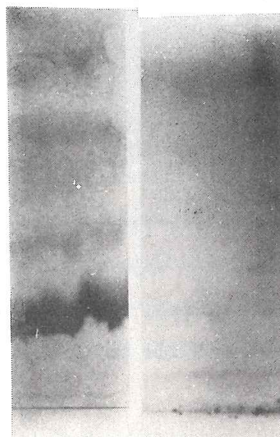
Ferner wurde das markierte Thyroxamin in das Thyroxamin-N-succinat übergeführt, das anschließend in den Systemen III und IV papierchromatographiert und radioautorgraphiert wurde, wobei sich wieder eine Übereinstimmung der entsprechenden Banden fand. Allerdings konnte ein Teil der Thyroxamin-Fraktion nicht in das Succinat übergeführt werden.

System IV



Thyroxamin

System III



Der Butanol-Extrakt von J^{131} markierten Rattenschilddrüsen, die mit Pankreatin enzymatisch hydrolysiert wurden, ergab nach isotopischer Cokristallisation keinen sicheren Nachweis von peptidgebundenem Thyroxamin.

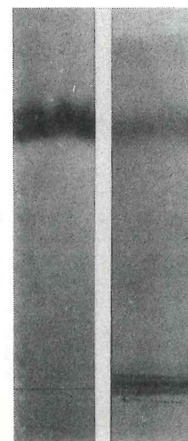
b) Aus dem Butanol-Extrakt von Rattenplasma ließ sich durch isotopische Cokristallisation eine Thyroxamin-Fraktion nachweisen, deren spezifische Radioaktivität jedoch erheblich geringer war als die der Thyroxamin-Präparate, die durch Extraktion aus nicht hydrolysierten Schilddrüsen derselben Tiere gewonnen waren.

Tabelle 2.

Cokristallisation aus Rattenplasma, 5.-8. Cokristallisation.

isoliertes Thyroxamin in mg	Aktivität in Imp/min	spezifische Aktivität
17,4	3 o4o	173
16,9	2 83o	161
15,4	2 42o	157
14,9	2 23o	15o

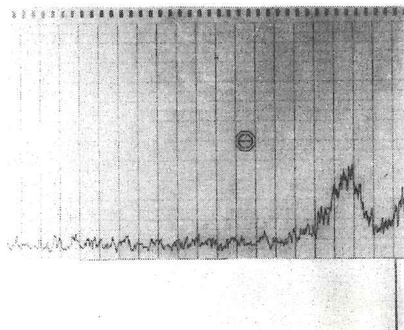
Ferner wurde eine Probe des markierten Thyroxamin in System VI papierchromatographiert und radioautographiert.



-Thyroxamin

Die Abbildung zeigt die Übereinstimmung der entsprechenden Banden.

Weiterhin wurde, wie oben angegeben, ein Eluat der Thyroxamin-Bande in System VIII absteigend papierchromatographiert und die Radioaktivität des Streifens gemessen. Auch hier stimmte die Radioaktivität mit der Lage der Bande überein, siehe Bild.



Es gelang jedoch keine Überführung in das Thyroxamin-N-succinat.

c) Die analoge Aufarbeitung des Plasmas von zwei Patienten mit Schilddrüsentumor-Metastasen, die mit hohen Gaben Radiojod behandelt waren, lieferte Thyroxamin-Fraktionen, die radioautographisch identifizierbar waren.

Tabelle 3a.

Cokristallisation mit Thyroxamin aus Humanplasma, 5.-8. Cokrist.

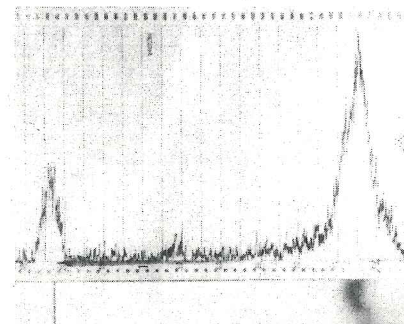
isoliertes Thyroxamin in mg	Aktivität in Imp/min	spezifische Aktivität
19,3	1 44o	75
12,6	58o	46
12,2	51o	42
1o,9	46o	42

Tabelle 3b.

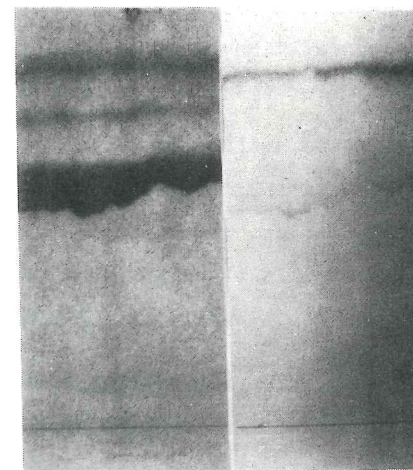
Cokristallisation mit Thyroxamin aus Humanplasma, 5.-8. Cokrist.

isoliertes Thyroxamin in mg	Aktivität in Imp/min	spezifische Aktivität
12,7	1 9oo	155
1o,9	1 18o	1o5
9,6	944	98
8,6	842	98

Von dem Cokristallisations-Präparat wurde aufsteigend in System XI ein Probepapierchromatogramm angefertigt und die Radioaktivität des Streifens gezählt. Die Hauptmenge der Aktivität fand sich in der Thyroxamin-Bande, wie die folgende Abbildung zeigt.



Das markierte Thyroxamin ließ sich in das Thyroxamin-N-succinat überführen, das in System III papierchromatographiert wurde. Die Radioautographie ergab übereinstimmende Banden, wie die folgenden Bilder zeigen.



V. Diskussion.

Zahlreiche Befunde verschiedener Autoren deuten darauf hin, daß die Tx-Synthese aus 2 Molekülen DIT mit einer Oxydationsreaktion verbunden ist (3o,32,37). Während in früheren Arbeiten im wesentlichen die Diphenyläther-Synthese als radikalische Reaktion gedeutet wurde, nimmt in neuerer Zeit Pitt-Rivers an (37), daß das aktive Zwischenprodukt ein ß-Hydroxy-Derivat des DIT darstellt. Zum Mechanismus der chemischen Reaktion der Diphenyläther-Synthese lieferte Pitt-Rivers selbst keine Vorstellung. Nach den Erfahrungen der organischen Chemie ist es wenig wahrscheinlich, daß die Oxydation eines DIT-Moleküls primär in einer ß-Hydroxylierung bestehen soll ohne Oxydation an der Aminogruppe und am Phenolsystem.

Nach den Vorstellungen von Hillmann (28), der auf Grund anaerober Inkubationsversuche mit DIB und DIT eine Tx-Bildung beobachten konnte, könnte DIB als energiereiches Zwischenprodukt bei der Tx-Synthese auftreten. Der erste Schritt bei der Tx-Synthese soll demnach in einer Oxydation an der Aminogruppe des DIT bestehen. Die zum Tx führende Kondensationsreaktion soll hierbei zu einer Phenylierungsreaktion führen (Formulierung siehe Seite 11).

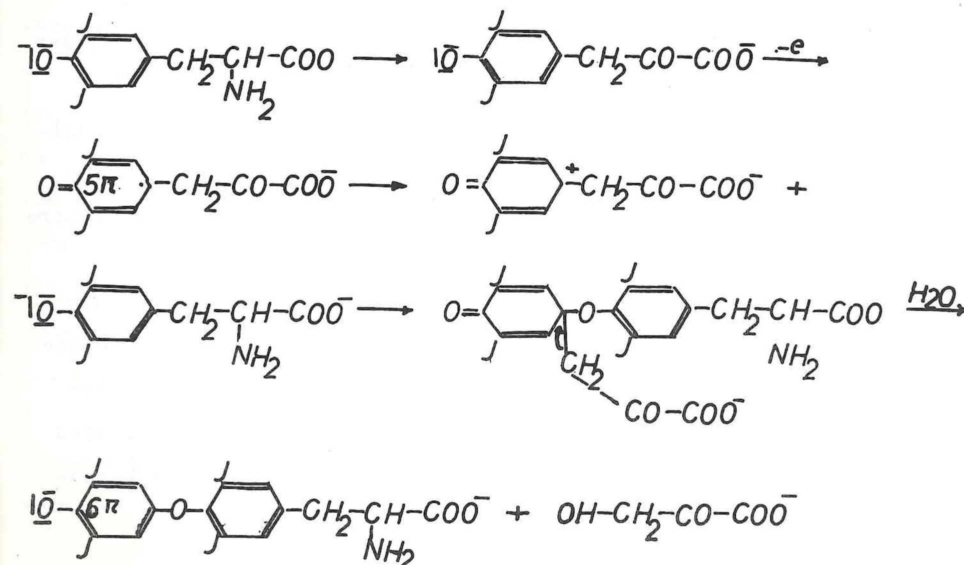
Da in den vorliegenden Untersuchungen sowohl DIBA als auch MIBA in J^{131} markierten Thyreoidea-Hydrolysaten nachgewiesen werden konnten, ist es wahrscheinlich, daß die Ketosäuren DIB und MIB, die auf Grund ihrer Instabilität selbst nicht nachweisbar sind, als Zwischenprodukte bei der biologischen Tx-Synthese auftreten.

Chaikoff und Taurog (39) hatten bei ihren Untersuchungen keinen Nachweis einer oxydativen Desaminierung in Thyreoidea-Hydrolysaten führen können, da sie zum papierchromatographischen Nachweis jodierter Aminosäuren ausschließlich das Collidin-System

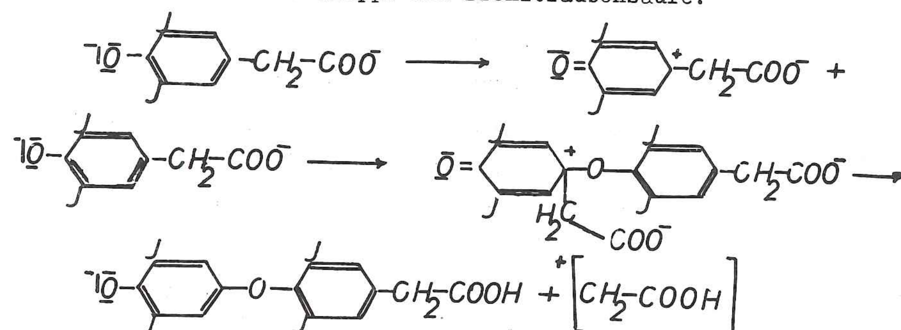
Mit dem Nachweis von DIBA und MIBA ist allerdings nur gezeigt, daß diese Aldehyde aus einer Oxydation von DIT und MIT im Laufe des Thyreoidea-Stoffwechsels herrühren. Ein Nachweis, daß DIB und MIB als Vorstufen für die biologische Tx-Synthese anzusehen sind, kann nur dann geführt werden, wenn ein Enzymsystem gefunden wird, welches auf DIB oder MIB als Substrat für eine Thyronin-Synthese eingestellt ist.

Bei der Inkubation von N-acetyl-N-methyl-DIT wurde kein Tx-Derivat gefunden. Es ist anzunehmen, daß durch die Blockierung am Stickstoff kein Zwischenprodukt mit aktivierter C-C-Bindung entstehen kann und die Diphenyläther-Synthese daher gehemmt wird. Nach der von Pitt-Rivers angenommenen Oxydation am ß-C-Atom müßte dieses Tx-Derivat entstehen.

Nach der von Hillmann angegebenen Formulierung des Reaktionsmechanismus könnte auch das von Pitt-Rivers gefundene Hydroxybrenztraubensäure-Derivat gebildet werden unter der Annahme, daß bei der Phenylierungsreaktion die Brenztraubensäure-Seitenkette als Kation abgespalten wird und mit dem OH-Anion des Wassers Hydroxybrenztraubensäure liefert.



Bei der aeroben Inkubation von 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylessigsäure und 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylpropionsäure wurde neben der erwarteten Tetrajodthyreoessigsäure bzw. Tetrajodthyreopropionsäure auch DIBA gefunden. Nach Pitt-Rivers erfolgt die Bildung der Tetrajodthyreoessigsäure über eine entsprechende Glykolsäure. Der Nachweis von DIBA jedoch deutet auf die leichte Oxydierbarkeit der Seitenkette hin. Es darf angenommen werden, daß der Reaktionsmechanismus in analoger Weise zu der oben diskutierten Tx-Synthese erfolgt, da die Carboxyl-Gruppe der Essigsäure auf die C-C-Bindung eines aromatischen Systems eine ähnlich labilisierende Wirkung ausübt wie die Keto-Gruppe der Brenztraubensäure.

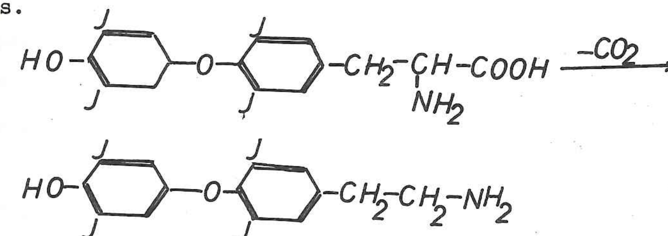


Die wesentlich erhöhte Ausbeute der Diphenyläther-Synthese bei der Inkubation von DIE (7%) gegenüber DIP (2,5%) deutet darauf hin, daß die Seitenkette einen entscheidenden Einfluß auf die Diphenyläther-Synthese hat. Es erscheint möglich, daß die Reaktion von 2 Molekülen DIP zur Tetrajodthyreopropionsäure über eine intermediäre Oxydation am α-Kohlenstoffatom erfolgt.

Außer DIBA, Tetrajodthyreoessigsäure, Tetrajodthyreopropionsäure und den Ausgangsmaterialien wurden keine weiteren Zwischenprodukte erhalten. Da jedoch nach den oben angeführten Untersuchungen bei der Inkubation von N-acetyl-N-methyl-DIT kein Tx-Derivat gefunden wurde, dürfte wahrscheinlich bei der Synthese der Tetrajodthyreopropionsäure eine α-Hydroxylierung eine Rolle spielen.

Als überraschender Befund konnte aus Ratten-Thyreoidea-Homogenaten durch Cokristallisation und Radioautographie Thyroxamin nachgewiesen werden. Es darf danach angenommen werden, daß Thyroxamin in der Schilddrüse durch Decarboxylierung entsteht, da das aus J^{131} markierter Ratten-Thyreoidea isolierte Cokristallisat eine höhere spezifische Radioaktivität aufwies als die aus Plasma isolierten Thyroxamin-Fraktionen.

Nach der Auswertung der Radioautogramme bei der Aufarbeitung von Ratten- und Humanplasma ergibt sich ein Gehalt von ungefähr 2% Thyroxamin, bezogen auf die Gesamtmenge des organisch gebundenen Plasma-Jods.



Thyroxamin war bisher lediglich synthetisch hergestellt worden und besitzt, wie bereits Seite 18 erwähnt, nur eine geringe periphere Wirkung. Da das Thyroxamin jedoch sowohl in Ratten-Schilddrüsen als auch in Humanplasma nachgewiesen werden konnte, darf es als echtes Thyreoidea-Hormon angenommen werden. Es erscheint möglich, daß das Thyroxamin wie auch das Trijodthyronamin einen besonderen, von den bisher bekannten Thyreoidea-Hormonen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus besitzen. Da nach den Untersuchungen von Thibault die Wirkung von Adrenalin auf den Darm in vitro durch Thyroxamin erheblich mehr verstärkt wird als durch Tx, liegt möglicherweise eine spezifische Wirkung auf den Zellstoffwechsel vor.

Die Frage nach der spezifischen Wirkung der einzelnen Thyreoidea-Hormone kann jedoch erst nach weiteren Experimenten beantwortet werden.

VI. Experimenteller Teil.

Material und Methoden.

Für die Untersuchungen wurden weiße männliche Ratten eines Inzuchtstammes im Gewicht von ca. 15og benutzt. Die Tiere erhielten eine einmalige intraperitoneale Injektion von jeweils looµC Jod^{131} in o,1 ml physiol. NaCl-Lösung und wurden nach 48 h durch Chloroform-Inhalation getötet. Das Citratblut wurde durch Herzpunktion gewonnen.

Das Radiojod wurde von A.E.R.E. Radiochem. Center, Amersham, England, bezogen.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Flüssigkeitszählrohr mit dem Zählgerät FH 9o der Firma Frieseke und Höpfner. Zur Auszählung der Papierchromatogramme wurde das Gerät FH 452 der gleichen Firma benutzt.

Die Radioautogramme wurden mit Adox-Röntgenfilmen hergestellt.

Für die Papierchromatographie wurde im allgemeinen das Papier Nr. 2o43 mgl. der Firma Schleicher und Schüll, für einige Chromatogramme das dickere Papier Nr. 2316 derselben Firma verwendet.

Die Messung der U.V.-Spektren erfolgte im Zeiß-Spektralphotometer.

Die Papierchromatographie wurde in folgenden Systemen durchgefüh

I	Phenol-n-Butanol-Eisessig-Wasser	5:2,5:1:5
II	Kollidin-Wasser	loo:35,5
III	Amylenhydrat-5n-Ammoniak	1:1
IV	Isoamylalkohol-5n-Ammoniak	1:1
V	Butanol-konz.Ammoniak	1:1
VI	Piperidin-Wasser	1:1
VII	Butanol-2n-Ammoniak	1:1
VIII	Dichlorbenzol-Formamid	1:1
IX	Äthylamin 2o% ige wässerige Lösung	
X	Äthylamin 33% ige wässerige Lösung	
XI	Methanol-konz.Ammoniak	1:1

Die Herstellung der Vergleichssubstanzen erfolgte nach folgenden Methoden:

4-Hydroxy-3,5-dijod-benzaldehyd (DIBA) : C.Paal (4o)

4-Hydroxy-3-jod-benzaldehyd (MIBA): C.Paal (41)

Thyroxamin: K. Tomita, H.A. Lardy (42)

Succinyl-thyroxamin:

1 mMol Dijodthyronamin wird mit 4 mMol Bernsteinsäureanhydrid in 8o ml Tetrahydrofuran 2h gekocht und eingeengt. Der Rückstand wird in n/lo NaOH unter Zusatz von wenig Äthanol 1 h stehen gelassen, beim Ansäuern fällt Succinyl-dijod-thyronamin aus.

o,57 mMol Succinyl-dijod-thyronamin in 32 ml n NaOH und 1,6 ml Piperidin werden unter Rühren mit 1,4 ml mol. J_2/KJ-Lösung tropfenweise versetzt, mit wenig Sulfit entfärbt. Beim Ansäuern mit HCl fällt Succinyl-thyroxamin aus.

Succinyl-thyroxamin wurde in System III papierchromatographiert, der Rf-Wert ist o,25, in System VI ist der Rf-Wert o,9.

Thyroxamin wurde in den Systemen VI und X papierchromatographiert. Die Rf-Werte betragen in beiden Systemen o,85.

Um das Thyroxamin sichtbar zu machen wurden die Papierchromatogramme nach Kendall zunächst in eine lo% ige Natriumnitrit-Lösung, anschließend in 2n HCl getaucht.

MIBA und DIBA wurden in den Systemen III und VII papierchromatographiert und gaben folgende Rf-Werte:

MIBA:	Rf in System III	o,4
DIBA:	Rf in System III	o,67
	Rf in System VII	o,73

MIBA und DIBA wurden auf den Papierchromatogrammen mit einer 5% igen Lösung von Dinitrophenylhydrazin in 2n HCl angefärbt.

<u>Das Vorkommen von MIBA und DIBA</u> wurde untersucht in

a) Thyreoidea-Extrakten ohne enzymatische Hydrolyse

b) Thyreoglobulin - Hydrolysaten

a) Die Schilddrüsen von 2o Ratten - Applikation von 1oo μC J^{131} pro Tier - wurden 48 h nach der intraperitonealen Radiojodgabe in 5 ml konz. Ameisensäure 3o' auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Verdünnen mit Wasser auf 3o ml wurde 3 mal mit je 3o ml Butanol extrahiert. Der Extrakt wurde eingeengt und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Nach Filtrieren und Einengen wurde der Rückstand in 1o ml Wasser gelöst, auf pH 5 gebracht und nach Zugabe von je 5 mg MIBA und DIBA zuerst mit Benzol und anschließend mit Amylenhydrat extrahiert. Die eingeengten Extrakte wurden in System I-IV papierchromatographiert.

b) Der Schilddrüsen-Extrakt in verdünnter Ameisensäure nach der Butanol-Extraktion wurde zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit 25o mg Pankreatin (Merck) in 1o ml Phosphatpuffer pH 8,4 2 Tage bei 37° hydrolysiert. Nach beendeter Hydrolyse wurde 3 mal mit Butanol extrahiert. Das Butanol wurde abdestilliert und der Rückstand wie oben bei pH 5 unter Zugabe von je 1o mg MIBA und DIBA mit Benzol extrahiert und in System I-IV papierchromatographiert.

<u>Nachweis von Thyroxamin.</u>

a) in Rattenschilddrüsen

b) in Rattenplasma

c) in Humanplasma

a) Der Butanol-Extrakt der nicht mit Pankreatin hydrolysierten Rattenschilddrüsen (s.o.) wurde eingeengt und der Rückstand in Äthanol unter Zugabe von 2o mg Thyroxamin gelöst.

Das durch Zugabe von Wasser ausgefällte Thyroxamin wurde 7 mal in 3% igem HCl-Äthanol gelöst und mit konz. Ammoniak ausgefällt. das Thyroxamin wurde schließlich in 1 ml Butanol aufgelöst und papierchromatographiert in System III, IV, VI, VIII.

b) 15o ml Citratblut von Ratten, 24 h nach der Injektion von 1oo μC Radiojod/Tier, wurden zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden noch 2 mal mit physiol. NaCl-Lösung gewaschen, Plasma und Kochsalzlösung wurden vereinigt. Die Erythrozyten wurden mit Digitonin-Lösung hämolysiert, im Hämolysat wurde nur sehr wenig Aktivität gemessen. Das Plasma wurde 3 mal mit Butanol extrahiert, der Extrakt mit konz. Ammoniak durchgeschüttelt und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 3o ml konz.Ammoniak-Methanol 1:2 aufgenommen und die ammoniakalische Lösung mit Petroläther gewaschen. Der Petroläther wurde abdestilliert und der Rückstand in 1o ml Eisessig-HCl 1:1 eine Stunde auf dem Wasserbad hydrolysiert. Nach Einengen zur Trockne wurde der Rückstand in konz. Ammoniak-Methanol aufgenommen, mit der ersten Ammoniak-Methanol-Lösung vereinigt, eingeengt und mit 2o mg Thyroxamin mehrmals umkristallisiert. Das Thyroxamin wurde in Tetrahydrofuran gelöst und zur Hälfte chromatographiert in System V, VI, VIII. Die andere Hälfte wurde mit der berechneten Menge Bernsteinsäureanhydrid 1 h auf dem Wasserbad erwärmt und in System VI und VIII papierchromatographiert.

c) Die Aufarbeitung des Humanplasmas erfolgte in derselben Weise wie beim Rattenplasma beschrieben. Für den Nachweis von Thyroxamin in Humanplasma wurde Blut folgender Patienten verwendet:

1) P.S. ♀ 47 Jahre, Langhans-Struma mit Riesenmetastasen,
Grundumsatz + 29%, 2-malige Verabreichung von Radiojod:
8.3.58 91 mC, 17. 4. 58 12o mC.
Untersuchung des Blutes 48 h nach Radiojod-Applikation.

2) A.D. ♀ 65 Jahre, metastasierendes Schilddrüsen-Carcinom, Grundumsatz + 19%, 3-malige Verabreichung von Radiojod: März 1955 loo mC, Juni 1955 8o mC, Juni 1958 12o mC. Untersuchung des Blutes 72 h nach Radiojod-Applikation.

Die Messung der Konzentration an Thyroxamin in den einzelnen Fraktionen der isotopischen Cokristallisation erfolgte im Zeiß-Spektralphotometer bei 32o mμ in 3% iger HCl-Alkohol-Lösung.

Inkubationsversuche.

Für die Inkubationsversuche benutzte Substanzen wurden wie folgt dargestellt:

a) N-acetyl-N-methyl-dijod-tyrosin:

N-methyl-tyrosin (43), Zers. 318°, wurde wie folgt jodiert: lo mMol N-methyl-tyrosin wurden in 2n HCl gelöst und mit 2o mMol JCl in konz. HCl bei 9o° unter starkem Rühren tropfenweise versetzt. Nach 2 stündigem Rühren wurde die Lösung auf pH 5 gebracht und gekühlt. Die entstandenen Kristalle wurden aus Alkohol-Wasser mehrmals umkristallisiert, in System I papierchromatographiert und zeigten mit DIT übereinstimmend einen Rf-Wert von o,75. N-methyl-dijod-tyrosin wurde nach Schotten-Baumann acetyliert, Fp 129° - 13o°.

b) 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylessigsäure:

4-Hydroxy-phenylessigsäure (bezogen von Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee, Wisconsin, USA) wurde wie folgt jodiert:

Zu einer Lösung von 15,2 g 4-Hydroxy-phenylessigsäure in 1 L Eisessig werden unter Rühren abwechselnd 51 g pulv. Jod und 32 g Quecksilberacetat in kleinen Portionen gegeben. Nach 2 h Weiterrühren wird das entstandene HgJ_2 abfiltriert, der Eisessig abdestilliert und der Rückstand mit konz. KJ-Lösung digeriert. Nach Umkristallisation aus Eisessig oder Alkohol-Wasser war der Fp 2o3°- 2o5°.

c) 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylpropionsäure:

4-Hydroxy-phenylpropionsäure (44) wurde in gleicher Weise wie N-methyl-tyrosin jodiert und mehrmals aus Alkohol-Wasser umkristallisiert. Fp 165°. Die Papierchromatographie in System I ergab den gleichen Rf-Wert wie Dijodtyrosin von o,75.

Für die Inkubationsversuche wurde von folgenden Verbindungen

a) N-acetyl-N-methyl-dijod-tyrosin
b) 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylessigsäure
c) 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylpropionsäure

eine 2% ige Lösung in Phosphatpuffer pH 7,8 hergestellt. Durch die Pufferlösungen wurde 18 Tage lang bei Zimmertemperatur über eine Fritte Luft geblasen und das pH alle zwei Tage neu eingestellt. Anschließend wurden alle Lösungen bei pH 7,8 mit Butanol extrahiert. Die Butanol-Extrakte wurden jeweils eingeengt und mit Petroläther versetzt. Die ausgefallenen Niederschläge wurden auf das Vorhandensein von

a) N-acetyl-N-methyl-thyroxin
b) Tetrajodthyreoessigsäure
c) Tetrajodthyreopropionsäure
d) 4-Hydroxy-3,5-dijod-benzaldehyd

untersucht.

Die wässerigen Lösungen nach der Butanol-Extraktion wurden bei pH 5 mit Benzol extrahiert und die Benzol-Extrakte auf das Vorkommen von DIBA untersucht.

VII. Zusammenfassung.

1) In Thyreoidea-Extrakten J^{131} markierter Ratten wurden 4-Hydroxy-3,5-dijod-benzaldehyd und 4-Hydroxy-3-jod-benzaldehyd ohne und mit enzymatischer Hydrolyse mit papierchromatographischen Methoden nachgewiesen.

2) Zur Klärung des Mechanismus der Biosynthese des Thyroxins wurden vergleichende Inkubationsversuche unter aeroben Bedingungen mit

   a) N-acetyl-N-methyl-dijod-tyrosin

   b) 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylessigsäure

   c) 4-Hydroxy-3,5-dijod-phenylpropionsäure

   durchgeführt. Die Versuche zeigten, daß durch Blockierung des H-Atoms am Stickstoff eine vollständige Hemmung der Diphenyläther-Synthese erfolgt. Die Versuche lassen den Schluß zu, daß die Diphenyläther-Synthese in einer Phenylierungsreaktion besteht unter Aufspaltung einer aktivierten C-C-Bindung.

3) Als Abbauprodukt von Thyroxin konnte Thyroxamin mit papierchromatographischen Methoden nachgewiesen werden in

   a) J^{131} markierten Ratten-Thyreoidea-Extrakten ohne enzymatische Hydrolyse

   b) J^{131} markiertem Rattenplasma

   c) Humanplasma von zwei Patienten nach therapeutischen Gaben von J^{131}.

VIII. Literatur.

1) E.Baumann — Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 21:481, 1896
2) E.Baumann, E.Ross — Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 21:481, 1896
3) A.Oswald — Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 27:14-49, 1899
4) A.Oswald — Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 7o:31o, 1911
5) E.C.Kendall — Transact.Amer.Ass.Physiciens 3o:42o, 1915
6) E.C.Kendall — J.Biol.Chem. 39:125, 1919
7) C.R.Harington — Biochem.J. 2o:3oo, 1926
8) J.Gross, R.Pitt-Rivers — Lancet 766, 1951
9) J.Gross, Pitt-Rivers — Lancet 439, 1952
1o) J.Roche, S.Lissitzky, R.Michel — Compt.rend.Acad. 234:997, 1952
11) A.Taurog, I.L.Chaikoff — J.Biol.Chem. 176:639, 1948
12) J.Roche, S.Lissitzky, R.Michel, O.Michel — Biochim.et Biophys.acta 7:439, 1951
13) J.Gross, Pitt-Rivers — Biochem.J. 53:645, 1953
14) J.Roche, R.Michel — Biochim.et Biophys.acta 19:3o8, 1956
15) A.Taurog, G.D.Potter, I.L.Chaikoff — J.Biol.Chem. 213:119, 1955
16) F.Bergmann — Lancet 1:51, 1954
17) C.P.Leblond, J.Gross — Endocrinology 43:3o6, 1948
18) A.L.Franklin, I.L.Chaikoff, S.B.Lerner — J.Biol.Chem. 153, 1954
19) W.P.Vanderlaan, A.Bissel — Endocrinology 39:157, 1946
2o) J.Roche, S.Lissitzky, O.Michel, R.Michel — Ann.Pharm.Franc. 9:163, 1951
21) D.M.Faweett, S.Kirkwood — J.Biol.Chem. 2o9:249, 1954
22) T.Bersin — Arzneim.Forsch. 7.3. 1957
23) C.R.Harington, G.Barger — Biochem.J. 21:169, 1927
24) W.Ludwig, P.v.Mutzenbecher — Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 244:IV, 1936

25)	P.v.Mutzenbecher	Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem.	261:253, 1939
26)	J.Roche,R.Michel	Fortschritte d.Chem. organ.Naturstoffe	Bd.XII 373, 1955
27)	J.Roche,R.Michel, W.Wolf,J.Nunez,C.R.Hebd	Seances Acad.sci.Paris	24o:921, 1955
28)	G.Hillmann	Ztschr.f.Naturforschung	Bd.XI Heft7,1956
29)	G.Hillmann	Klin.Wochenschrift	35:1124, 1957
3o)	J.Roche,R.Michel	Advances in Protein.Chem.	6:253, 1951
31)	C.R.Haringtom, R.Pitt-Rivers	Biochem.J.	39:157, 1954
32)	R.Pitt-Rivers	Biochim.et Biophys.acta	2:311, 1948
33)	K.Ohno	Private Communication Akabori Laboratory, Okasa, Japan	
34)	R.Pitt-Rivers	Biochem.J.	43:223, 1948
35)	T.B.Johnson, L.B.Tewkesbury	Proc.Nat.Acad.Sc.	28:73, 1942
36)	C.R.Harington	J.Chem.Soc.	193, 1944
37)	R.Pitt-Rivers	Biochem.J.	7o:173, 1958
38)	O.Thibault,A.Lachaze	C.R.Seances Soc.Biol.Filiales	145:797, 1951
39)	I.L.Chaikoff,A.Taurog	J.Biol.Chem.	2o7:59, 1954
4o)	C.Paal	Ber.dtsch.Chem.Ges.	28:24o7, 1895
41)	C.Paal	Ber.dtsch.Chem.Ges.	28:2413, 1895
42)	K.Tomita,H.A.Lardy	J.Biol.Chem.	219:6o2, 1956
43)	Eridman, Gutmann	Biochem.Zeit.	493, 191o
44)	Hlasiwetz	Liebig Ann.d.Chem.	142:358, 1878
45)	Timann, Herzfeld	Ber.dtsch.Chem.Ges.	2o:2529, 1877

Lebenslauf.

Ich, Parwiz Taslimi, wurde am lo. Juli 1919 als Sohn des Grundbesitzers Mohammed Taslimi und seiner Ehefrau Sakine in Kazwin, Iran, geboren. Von 1927 - 1933 besuchte ich die Grundschule in Kazwin, anschließend die Oberschule in Teheran. Dort legte ich 1941 die Reifeprüfung ab und begann mit dem Studium der Chemie an der Technischen Hochschule Teheran (Honarsaraje - Ali).1945 erhielt ich das Diplom als Chemie-Ingenieur.

1946 verheiratete ich mich mit Aladocht Alai. 1948 und 1951 wurden unsere beiden Kinder geboren.

Von 1947 - 1948 arbeitete ich als Chemie-Ingenieur in der Öl-raffinerie in Abadan. 1948 ging ich als Chemie-Assistent an die Universität Teheran und gab ab 1949 gleichzeitig an der Alborz-Oberschule, Teheran, Chemieunterricht. 1954 wurde ich zum stellvertretenden Leiter des chemischen Laboratoriums der veterinär-medizinischen Fakultät ernannt. 1955 erhielt ich von der Universität Teheran die Genehmigung, meine wissenschaftliche Ausbildung in Deutschland zu vervollkommnen. Im Wintersemester 1955/56 wurde ich an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, immatrikuliert.

IDS Bibliotheken Bern
BM 3 153 847